

審査の結果の要旨

氏名 陳 西貴

本研究は神経細胞の情報伝達の基礎構造であるシナプス形成のメカニズムを明らかにするため、軸索終末に局在する IIa 型 RPTP は軸索終末の分化にどのような役割の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ゼブラフィッシュゲノムデータベースサーチにより、少なくとも6個の IIa 型 RPTP の分子があり、そのうち、マウスの PTP σ に最も相同性が高い遺伝子をクローニングし、PTP σ a と名付けた。ゼブラフィッシュ PTP σ a は、全長でマウス PTP σ 、LAR、PTP δ に対して 70%、62%、66%の相同性を有していた。ゼブラフィッシュの PTP σ a は、マウスの PTP σ 、LAR と PTP δ と同様に細胞外に 三つの Immunoglobulin-like domain と八つの Fibronectin-like domain、細胞内に二つの Phosphatase domain を有していた。
2. In situ ハイブリダイゼーション法によって、ゼブラフィッシュの胚内での PTP σ a mRNA の発現を調べたところ、PTP σ a mRNA のハイブリダイゼーションシグナルが嗅上皮や網膜ガングリオン細胞層を含む広い範囲で観察された。
3. プレシナプス形成における *in vivo* で PTP σ a の機能を検討するために、PTP σ a の脱リン酸化酵素の活性中心に点変異を導入し、不活性型に改変した PTP σ a (PTP σ aC1556S) を作成した。そして、シナプス小胞のマーカータンパク VAMP2-EGFP と PTP σ a、VAMP2-EGFP と PTP σ aC1556S を同一の嗅神経細胞で発現させるための omp プロモーターを用いたダブルカセットベクター(Pomp-VG-PTP σ a と Pomp-VG-PTP σ aC1556S)を構築した。Pomp-VG-PTP σ a と Pomp-VG-PTP σ aC1556S をゼブラフィッシュ胚に導入し、嗅神経細胞において PTP σ a と PTP σ aC1556S を発現させて、軸索終末へのシナプス小胞マーカータンパク VAMP2-EGFP の集積を観察した。PTP σ a はシナプス形成期の受精後 60時間と 84時間の VAMP2-EGFP の集積へは影響しなかった。一方、嗅神経細胞において PTP σ aC1556S を発現させると、VAMP2-EGFP の集積がレポーター遺伝子のみを発現させたコントロールに比べて受精後 60時間、84時間いずれも増加することがわかった。
4. 細胞膜のマーカータンパク GAP43-EGFP と PTP σ aC1556S のダブルカセ

ットベクター (Pomp-GG-PTP α C1556S) を発現させ、軸索終末の形態変化を観察したところ、影響が認められなかった。

5. 電子顕微鏡を用いてシナプスの微細構造を解析した。PTP α C1556S の発現ベクターを導入した胚ではレポーター遺伝子のみを発現した胚に比べて嗅神経細胞—僧帽細胞様シナプスにおいてシナプス小胞密度、docked synaptic vesicle と clustered synaptic vesicle が増加していた。一方、PSD の長さには差は認められなかった。更に僧帽細胞—periglomerular 細胞様シナプスにおいては PTP α C1556S の発現ベクターを導入した胚とレポーター遺伝子のみを発現した胚の間でシナプス小胞密度、PSD の長さ、docked synaptic vesicle の数、clustered synaptic vesicle の数に差がなかった。

以上、本論文はゼブラフィッシュの嗅神経細胞の軸索終末において、PTP α がアクティブゾーンに接したシナプス小胞の集積とアクティブゾーン近傍でシナプス小胞の集積を調節することを示している。これらのシナプス小胞は電気生理学的には readily releasable pool と考えられている。本研究はシナプス形成時期のシナプス前終末分化の調節機構の一端を明らかにしたもので、この領域に重要な貢献をなすとかんがえられ、学位の授与に値するものと考えられる。